

# **Biomarkörer i ledvätska och serum som metod för att diagnostisera osteoartrit hos häst**

*Moa Isaksson*



*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:38*



# Biomarkörer i ledvätska och serum som metod för att diagnostisera osteoartrit hos häst

## Biomarkers in synovial fluid and serum as a diagnostic method to detect equine osteoarthritis

*Moa Isaksson*

**Handledare:** Eva Skiöldebrand, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:** Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2017:38

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsfoto:** Alice Olander

**Nyckelord:** biomarkörer, COMP, CTX-II, häst, inflammation, ledbrusk, ledsjukdom, osteoartrit,  
**Key words:** articular cartilage, biomarkers, COMP, CTX-II, horse, inflammation, joint disease, osteoarthritis

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för BVF



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>SAMMANFATTNING .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>INLEDNING.....</b>	<b>3</b>
<b>MATERIAL OCH METODER.....</b>	<b>3</b>
<b>LITTERATURÖVERSIKT.....</b>	<b>4</b>
<b>Synovialleden – anatomi &amp; fysiologi.....</b>	<b>4</b>
<i>Ledbrosk .....</i>	<i>4</i>
<i>Subkondralt ben .....</i>	<i>9</i>
<i>Ledkapsel .....</i>	<i>9</i>
<i>Ligament, muskler &amp; senor .....</i>	<i>9</i>
<b>Osteoartrit.....</b>	<b>10</b>
<i>Etiologi .....</i>	<i>10</i>
<i>Patogenes .....</i>	<i>10</i>
<i>Patologiska förändringar i olika sjukdomsstadier .....</i>	<i>12</i>
<i>Diagnostik .....</i>	<i>13</i>
<b>Biomarkörer.....</b>	<b>14</b>
<i>BIPED.....</i>	<i>14</i>
<i>Potentiella biomarkörer .....</i>	<i>14</i>
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>17</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING.....</b>	<b>19</b>



## **SAMMANFATTNING**

Synovialleden är den vanligaste ledtypen i hästens extremiteter och drabbas ofta av osteoartrit (OA). Leden består av flera delar som samverkar med varandra, både i friska och sjuka leder, därför bör den betraktas som ett organ. De olika delarna som utgör en synovialled är subkondralt ben, ledbrosk, ledvätska, ligament, senor, muskler och en ledkapsel bestående av två lager. Ledbrosket är uppbyggt av en celltyp som endast utgör en liten andel, resten fylls ut av ett extracellulärt matrix. Matrixet ger ledbrosket förmåga att fördela kraft som verkar på leden, genom att förse brosket med specifika biomekaniska förmågor. Normalt brosk har en balanserad metabolism bestående av anabola och katabola processer som pågår samtidigt och resulterar i en kontinuerlig omsättning av vävnaden.

OA är en progressiv sjukdom som orsakar obalans i den normala broskmetabolismen, vilket resulterar i nedbrytning av ledbrosket. Sjukdomen är komplex och har flera potentiella bakomliggande orsaker, bland annat tros trauma och inflammation leda till utvecklingen av OA. Smärta och håltå uppstår till följd av ledförändringarna och är de vanligaste åkommorna hos svenska hästar och även den vanligaste utslagsorsaken. Patogenesen är inte helt fastställd och idag är det inte möjligt att upptäcka tidiga sjukdomsförändringar, eftersom de tillgängliga diagnostiska metoderna är för okänsliga. Sjukdomen yttrar sig kliniskt i ett sent skede, varför broskskadorna oftast är irreversibla innan diagnos ställs. Därför är det önskvärt att utveckla diagnostiska metoder för att upptäcka sjukdomen i ett tidigare skede. Syftet med denna litteraturstudie är att avgöra om det är möjligt att diagnostisera patienter med OA på individnivå genom att använda biomarkörer.

Biomarkörer är en objektiv metod som anses ha potential att användas för att diagnostisera OA. 2006 myntades ett klassificeringssystem som syftar till att underlätta forskningen genom att dela in markörerna i olika grupper beroende på funktion. Det finns flera typer av biomarkörer, i detta arbete fokuseras på de lösliga markörerna, dvs de som kan finnas i serum, synovia och urin. Nedbrytningen av ledbrosket sker i en särskild ordning och ger upphov till unika fragment, dessa tros kunna mätas och ge en bild av sjukdomsförloppet och öka förståelsen kring patogenesen.

Ett flertal studier om biomarkörer har gjorts, men det finns få som genererat upprepbara resultat. Den stora spridningen på resultaten och mätvärdena av biomarkörer i patienter gör det svårt att fastställa tröskelvärden för att skilja sjuka patienter från friska kontroller. Framtida forskning måste syfta till att öka känsligheten på mätmetoderna och därmed deras förmåga till detaljerade mätresultat gällande biomarkörer. I dagsläget går det inte att mäta biomarkörer i synovia och serum för att diagnostisera individuella patienter med OA.

## SUMMARY

Synovial joints are the most common type of joint in the extremities of the horse. It is also the type of joint most prone to develop osteoarthritis (OA). The synovial joint is to be considered an organ, it consists of several parts that collaborate in both normal and diseased joints. The basic set of parts in the joint is subchondral bone, articular cartilage, synovial fluid, ligaments, tendons, muscles and a joint capsule involving two layers. Articular cartilage consists of a small percentage of a single type of cellular component and a voluminous extracellular matrix, that provides the articular cartilage with its specific biomechanical properties and ability to withstand load. In healthy cartilage the normal metabolism is a homeostasis between anabolic and catabolic processes that take place simultaneously, the result is a continuous tissue turnover.

OA is a progressive disease that cause an imbalance of the normal processes in the cartilage that lead to degradation of the articular cartilage. The disease is complex and the pathogenesis is yet to be fully determined and understood. There are a few potential reasons for the development of OA, two of which are trauma and inflammation. OA causes joint pain and lameness, the most frequent disorders of horses in Sweden and a common reason for disposal. The disease manifests clinically in a late phase and the methods for diagnose that are available today does not enable early detection of the disease, because of their lack of sensitivity. It is desirable to develop diagnostic methods that have sufficient capacity to discover the early changes that occur in OA. Early detection would be valuable, since the late phases of OA results in irreversible damages to the articular cartilage. The purpose of this review is to determine if biomarkers can be used to diagnose OA in individual patients.

Biomarkers are considered a potential and objective method for diagnose of OA and in 2006 a classification scheme was created to divide the markers into different groups depending on their function, to facilitate research. There are many types of biomarkers, but the ones that are included in this review are the soluble markers, i.e. the ones that could be detected in serum, synovia and urine. The degradation of the articular cartilage occurs in a time-dependent order and measuring concentrations of the unique fragments that form could provide a real-time view of the ongoing pathological processes, as well as increase the understanding of OA and shed some light on the pathogenesis.

Many studies of biomarkers have been done, but few have come up with reproducible results. The wide distribution of results and values of different biomarkers in patients makes it impossible to establish a threshold to distinguish OA-patients from healthy controls. Future research must focus on developing an increased sensibility in measuring levels of biomarkers in synovia and serum, to enable the use of them for diagnose of OA in individual patients, something that is not possible in the current situation.



## INLEDNING

Osteoartrit (OA) är en kronisk progressiv ledsjukdom (Liu-Bryant & Terkeltaub, 2015) och en vanlig orsak till hälta hos hästar. Synovialleden är den vanligaste ledtypen i hästens extremiteter och drabbas ofta av OA (McIlwraith *et al.*, 2016). Sjukdomen yttrar sig kliniskt i ett sent skede och de diagnostiska metoder som används idag kan inte upptäcka tidiga förändringar (Rousseau & Garnero, 2012), varför sjukdomen ofta når irreversibla stadier innan den upptäcks (Skiöldebrand *et al.*, 2017).

OA karaktäriseras bland annat av en obalans i den normala broskomsättningen som leder till brosknedbrytning (Skiöldebrand, 2004), detta initieras troligtvis av inflammation (Berenbaum, 2012) och/eller trauma (McIlwraith *et al.*, 2016). Vid nedbrytningen sker en fragmentering av broskets extracellulära matrix och unika klyvningsfragment bildas. Vissa fragment har kunnat påvisas i ledvätska med hjälp av ELISA (Skiöldebrand *et al.*, 2017), därför anses de ha potential att användas som biomarkörer för att skildra anabola och katabola processer och därmed rådande sjukdomssituation i specifika leder (Skiöldebrand, 2004). Biomarkörer tros kunna möjliggöra upptäckt av sjukdomen innan irreversibla ledskador uppkommer (McIlwraith *et al.*, 2016). Denna litteraturstudie syftar till att avgöra ifall de biomarkörer som hittills upptäckts hos häst kan användas för att diagnostisera enskilda individer med OA.

## MATERIAL OCH METODER

PubMed och Web of Science användes för följande sökningar:

- joint AND horse\* OR equine
- osteoarthritis OR OA AND horse\* OR equine
- biomarkers AND OA OR osteoarthritis
- BIPED AND osteoarthritis OR OA OR arthritis
- equine\* AND cartilage AND degradation AND COMP
- equine\* AND cartilage AND degradation AND CTX\*

Referenslistor från vetenskapliga artiklar samt reviewartiklar användes sedan för att hitta fler relevanta referenser.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Synovialleden – anatomi & fysiologi

Synovialleden är den vanligaste ledtypen i hästens extremiteter samt den ledtyp som oftast drabbas av OA och orsakar kliniska besvär (McIlwraith *et al.*, 2016). Detta arbete kommer av den anledningen endast behandla denna ledtyp.

En synovialled består av flera strukturer som tillsammans klassas som ett organ, eftersom de interagerar med varandra både i friska och sjuka leder. Grundstrukturerna är två broskbeklädda ledytor som omsluts av en ledkapsel bestående av två lager, ledkapseln omges i sin tur av senor och ligament. Ledhålan som uppstår mellan broskytorna och de periartikulära strukturerna fylls ut av ledvätska, även kallat synovia. Under ledbrosket finns det subkondralt ben (Bild 1). Ledens uppgift är att möjliggöra rörelse mellan olika benstrukturer och fortplanta rörelseenergin som uppkommer när hästen förflyttar sig (McIlwraith *et al.*, 2016).

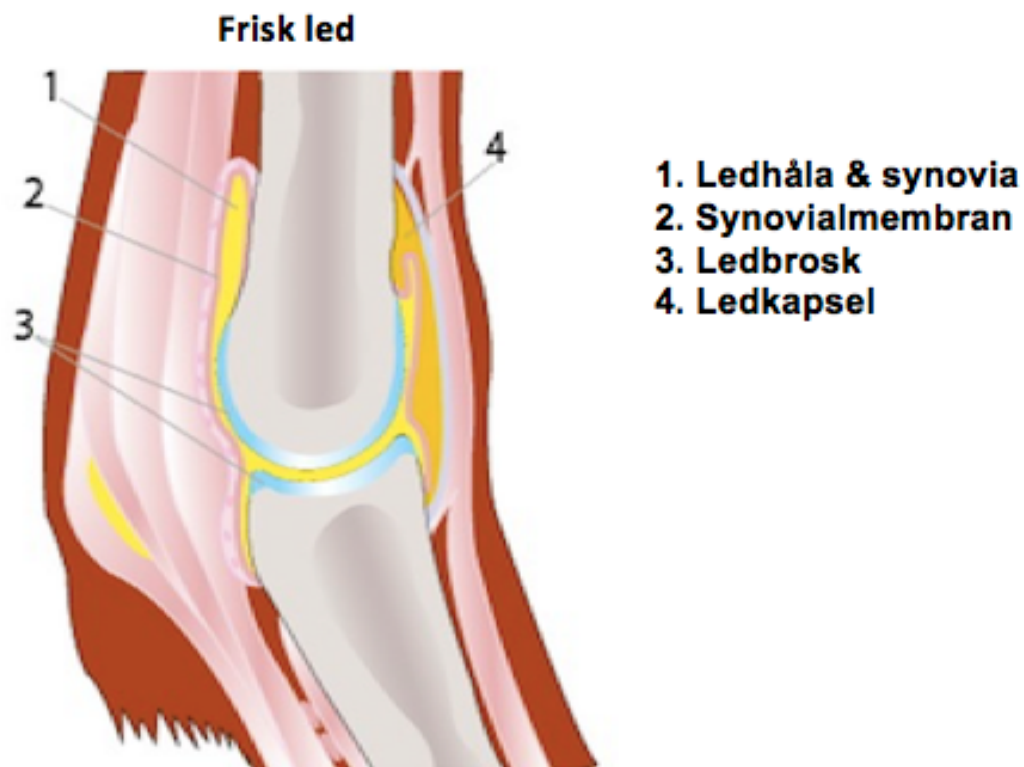


Bild 1. Synovialledens uppbyggnad i kötled hos häst (modifierad bild, original av Li Gessbo, 2004)

### Ledbrosk

Ledbrosk hos en adult häst är en förhållandevis cellfattig vävnad, innehållet av kondrocyter utgör endast 1-12% av den totala volymen (McIlwraith *et al.*, 2016). Cellerna omges av ett extracellulärt matrix (ECM) som utgör grundsubstans. Det vuxna brosket saknar både blodförsörjning och innervering (Palmer & Bertone, 1994). Broskets viktigaste funktioner är att tryckfördela samt tillåta ledytorna att samverka med så låg friktion som möjligt (Skiöldebrand, 2004).

Det artikulära brosket är uppbyggt av fyra zoner: den ytliga zonen, intermediärzonen, den djupa zonen och den kalcifierade zonen (Bild 2). Broskets sammansättning skiljer sig i de olika zonerna beroende på avstånd till ledytan, vilken typ av led och vilket område i leden det bekläder samt individens ålder (Palmer & Bertone, 1994).

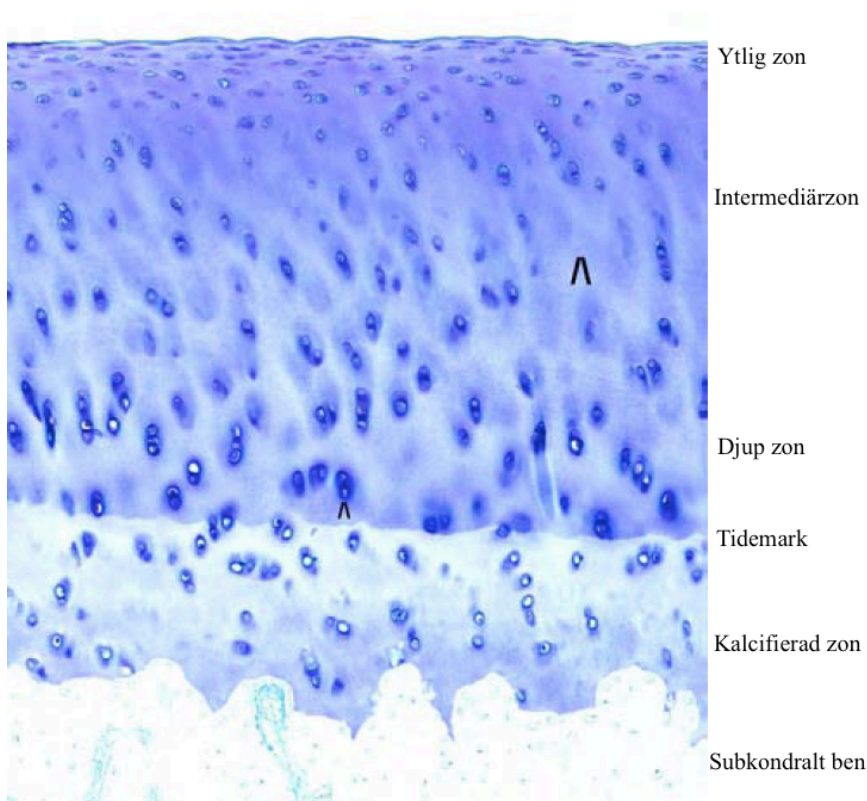


Bild 2. Histologisk bild av ledbroskets olika zoner. Den stora pilspetsen markerar interterritoriellt matrix och den lilla territoriellt matrix (modifierad bild från Skiöldebrand, 2004).

De tre översta zonerna utgör den hyalina delen av brosket och saknar tydlig avgränsning sinsemellan (McIlwraith *et al.*, 2016). I den ytliga zonen finns rikligt med långsmala kondrocyter och fibriller av kollagen typ II. Fibrillerna är arrangerade parallellt med ledytan (Palmer & Bertone, 1994). Vatteninnehållet är förhållandevis högt och koncentrationen av proteoglykaner (PG) är lågt (McIlwraith *et al.*, 2016).

Intermediärzonen har högre PG-halt och lägre vatteninnehåll än den ytliga zonen (McIlwraith *et al.*, 2016). Kollagenfibrillerna förekommer i lägre koncentration och är slumpartat organiserade. Kondrocyterna är större, rundare och förekommer ensamma eller i par (Palmer & Bertone, 1994), slumpmässigt utspridda i ECM (McIlwraith *et al.*, 2016).

Den djupa zonen har lägst vatteninnehåll och koncentration av kollagenfibriller, samt rikligast PG-koncentration (McIlwraith *et al.*, 2016). Kondrocyterna är staplade i kolumner som sträcker sig mot ledytan (Palmer & Bertone, 1994).

Tidemark är den histologiska gränsen mellan kalcifierat och icke-kalcifierat brosk. Kondrocyterna i den kalcifierade zonen är organiserade individuellt eller i kolumner. Det extracellulära matrixet är mineraliserat, sånär som på ett tunt lager av icke-mineraliserat matrix i kondrocyternas omedelbara närhet. Innehållet av kollagen och PG är lågt (Palmer & Bertone, 1994).

**Kondrocyten** syntetiserar alla komponenterna till ECM, både molekylerna som utgör broskvävnaden och de katabola enzym som bryter ner och omsätter den.

Broskomsättningen är en långsam process. Det förekommer en strikt reglerad balans mellan uppbyggnad och nedbrytning av komponenterna (Sandell & Aigner, 2001).

Tillväxtfaktorer och enzymer reglerar denna balans. I normal broskvävnad byts matrixkomponenterna ut kontinuerligt i och med homeostasen mellan anabola och katabola processer (Skiöldebrand, 2004), däremot är den proliferativa aktiviteten i själva kondrocyterna nästan obefintlig (Sandell & Aigner, 2001).

Eftersom kondrocyterna omges av ECM saknar de direktkontakt med varandra och måste kommunicera via matrixet (Skiöldebrand, 2004). Denna kommunikation är ett komplext samspel och cytoplasmatiske processer på cellerna tros spela en viktig roll i kommunikationen genom att upptäcka förändringar i cellens omgivning (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Extracellulärt matrix** är viktigt eftersom det ger brosket sina unika biomekaniska egenskaper, det bidrar till draghållfasthet samt möjliggör stötdämpning (Skiöldebrand, 2004). Samverkan mellan olika matrixkomponenter ger upphov till ett högt osmotiskt tryck som medför att vatten diffunderar in i vävnaden och gör att brosket kan motstå kompression som uppstår vid belastning (Palmer & Bertone, 1994).

Den exakta sammansättningen av ECM varierar, vattenhalten är mellan 70-80%. Den återstående andelen utgörs i torrsvikt av 50% kollagen, 35% PG, 10% glykoproteiner (exempelvis tillväxtfaktorer och reglerande molekyler). Återstående 5% består av mineraler, lipider och cellulära komponenter (McIlwraith *et al.*, 2016).

Matrixet som omger kondrocyterna består av tre zoner. Det pericellulära matrixet är i cellernas omedelbara närhet och omsluter enskilda celler. Utanför denna zon finns territoriellt matrix och här sker monteringen av ECM-komponenterna efter syntes i kondrocyten. Det matrix som fyller ut utrymmet mellan kondrocyterna kallas interterritoriellt och utgör den största andelen av totalt ECM (Bild 3) (Skiöldebrand, 2004).

**Kollagena proteiner** är en beståndsdel i ECM, av dem är kollagen typ II den vanligaste och utgör 85-90% av det totala kollageninnehållet (Palmer & Bertone, 1994). Molekylen bildar fibriller och proteinstrukturen är uppbyggd av tre identiska  $\alpha_1$ -kedjor snurrade runt varandra i en trippelhelix (McIlwraith *et al.*, 2016). Fibrillerna ger ledbrosket stabilitet, styvhet och förmåga att motstå dragkrafter (Palmer & Bertone, 1994). Stabiliteten fås genom att kollagenfibrillerna fungerar som armeringsjärn i brosket, de korsbinder både med andra  $\alpha_1$ -kedjor i samma molekyl och med andra fibriller (McIlwraith *et al.*, 2016).

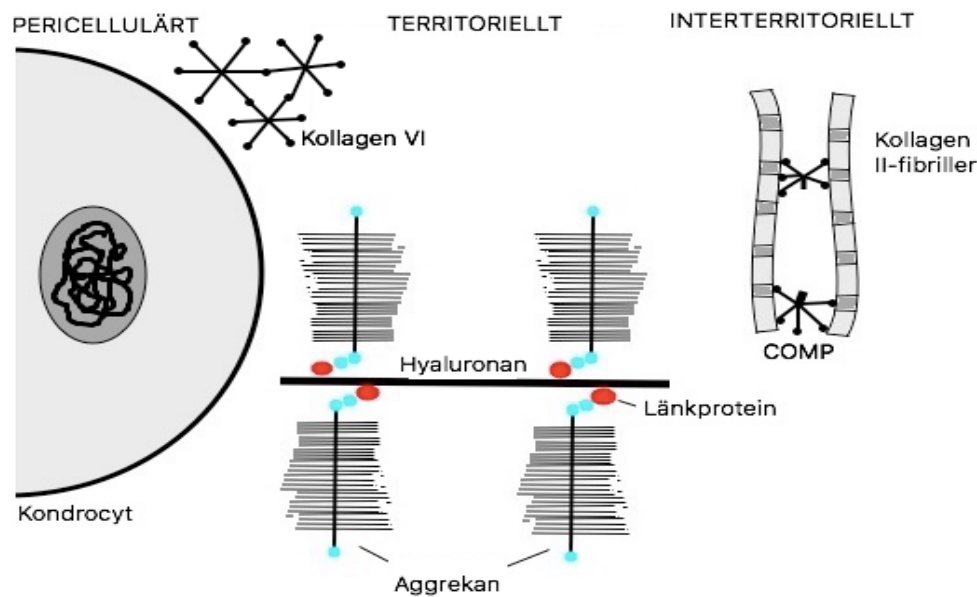


Bild 3. De olika zonerna i det extracellulära matrixet, pericellulärt matrix är området precis runt kondrocyten, territoriellt matrix är området utanför cellen och interterritoriellt matrix är beläget mellan cellerna. Bilden visar några av de molekyler som förekommer i respektive zon (egen omarbetning av Heinegård & Saxne, 2011)

Det finns även andra typer av kollagen i ledbrösket, bland annat typ III och VI som är lokaliserade i det pericellulära matrixet. Kollagen typ VI bildar inte fibriller och är en viktig beståndsdel i chondron – en struktur som utgörs av kondrocyten och dess direkta omgivning. Chondron är en viktig funktionell och metabolisk enhet i det hyalina brosket (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Proteoglykaner** (PG) ger brosket styvhet och förmåga att motstå kompression (Palmer & Bertone, 1994). Molekylstrukturen består av en socker- och en proteinkomponent, PG är lokaliserat mellan kollagenfibrillerna och håller ihop dem (McIlwraith *et al.*, 2016). Den vanligaste proteoglykanen i ledbrösk är aggrekan, en molekyl med hög molekylvikt och förmåga att binda till hyaluronan, en glukosaminoglykan (se Bild 4) (Palmer & Bertone, 1994). Kondroitinsulfat och keratansulfat utgör sockerkedjorna som ingår i aggrekan, sulfatgrupperna är negativt laddade och ger molekylen sin viskositet (McIlwraith *et al.*, 2016).

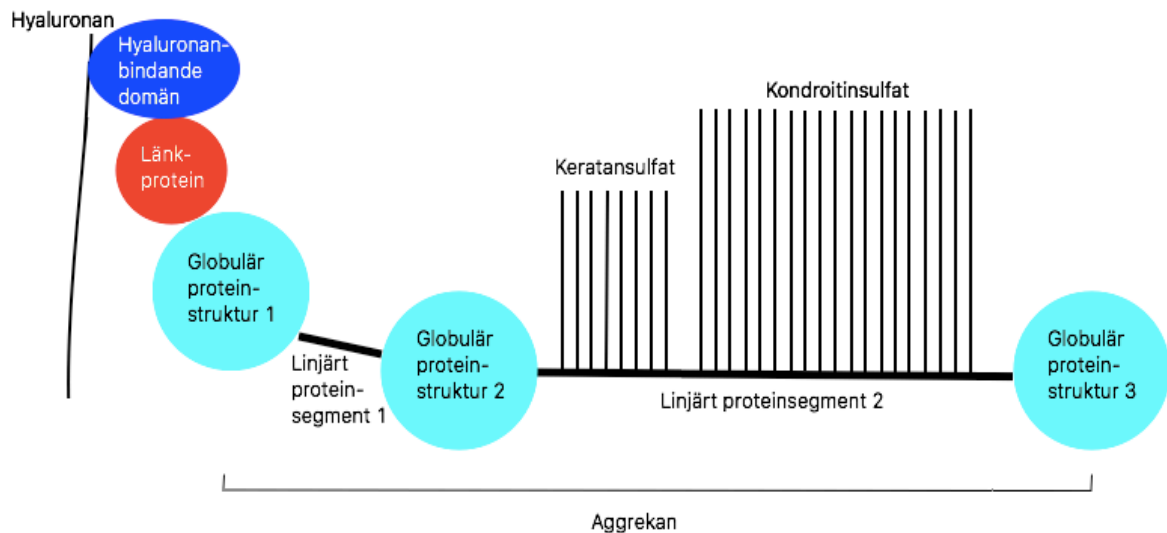


Bild 4. Proteoglykanen aggrekan består av tre globulära proteinstrukturer och två linjära proteinsegment, där det första linjära segmentet kombinerar de två första globulära strukturerna. Det andra linjära segmentet kombinerar andra och tredje globulära strukturerna och har två typer av glukosaminoglykaner, kondroitinsulfat och keratansulfat, kopplat till sig. Bindningen mellan aggrekan och glukosaminoglykanen hyaluronan sker med hjälp av ett länkprotein, som förenar den hyaluronanbindande domänen med aggrekanets första globulära struktur (egen omarbetsning av Sofat, 2009; Palmer & Bertone, 1994).

**Glukosaminoglykaner** (GAGs), exempelvis kondroitinsulfat (CS) och keratansulfat (KS) ingår i aggrekanmolekylen, de spelar en viktig roll eftersom de med sina laddade sulfatgrupper binder vattenmolekyler samtidigt som de repellerar varandra. CS är uppbyggt av upprepade disackaridsekvenser av D-glukuronat och N-acetyl-D-galaktosamin (Garvican *et al.*, 2010). KS består av upprepningar av disackariderna galaktos och N-acetylglukosamin (McIlwraith *et al.*, 2016).

Hyaluronan (HA) är också en GAG men saknar laddning eftersom den saknar sulfatgrupper. Molekylen stärker brosket genom att binda till aggrekan (Palmer & Bertone, 1994). HA är en vanligt förekommande komponent i ECM (McIlwraith *et al.*, 2016), men förekommer även fritt i synovia (Sofat, 2009).

**Icke-kollagena proteiner** i ECM, exempelvis COMP (cartilage oligomeric matrix protein) är ett glykoprotein som även kallas trombospodin 5 (Skiöldebrand, 2004). Molekylen tros vara viktig för att organisera kollagenfibrillerna i ledbrusket till nätverk, detta tack vare sin uppbyggnad av 5 identiska subenheter sammansatta till en pentamer (Skiöldebrand *et al.*, 2005). Molekylen har en viktig funktion för normal broskutveckling och matrixsammansättning (Garvican *et al.*, 2010) eftersom COMP-mutationer har visat sig ge störningar i broskbildningen och tillväxtzoner i subkondralt ben (Roughley, 2001).

### **Subkondralt ben**

Subkondralt ben utgörs vanligtvis av ett lager kompakt ben och skiljer det trabekulära benet från det överliggande ledbrösket. Benytan består av oorganiska mineralsalter och organiska komponenter, exempelvis kollagen typ I, PG, GAG och vatten. Mineralsalterna ger benet hårdhet och stadga, och de organiska komponenterna ger benet en viss flexibilitet (McIlwraith *et al.*, 2016).

Till skillnad från ledbrösket är det subkondralt benet både kärlförsörjt, innerverat och har en intensiv metabolism. Benet har därmed hög regenerativ förmåga och en känslighet för både fysiologiskt och patologiskt stimuli. Nociceptorer förekommer i benvävnaden och gör den känslig för smärtstimulering (McIlwraith *et al.*, 2016).

### **Ledkapsel**

Strukturen som utgör ledhållans yttre avgränsning består av två lager, en yttre fibrös ledkapsel, samt ett inre synovialmembran. Ledkapseln ger mekanisk stabilitet (Dyce *et al.*, 2010) och förser även hjärnan med viktig information om rörelse i leden, tack vare riklig förekomst av proprioceptiva nervändar (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Synovialmembranet** består i sin tur av två lager: subintima och intima. Subintiman består av fibrös bindväv, medan intiman är uppbyggd av synoviocyter som vilar på subintimans bindvävsbädd. Intiman består av ett cellager som är 1-4 celler tjockt, som linjerar insidan av ledkapseln och har direktkontakt med ledhålan och ledvätskan (Palmer & Bertone, 1994). Synovialmembranet saknar basalmembran och är rikligt kärlförsedd. Detta gör att blodplasma kan passera in i ledhålan genom aktiv transport av synoviocyterna, medan större molekyler inte tar sig in (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Synoviocyter** förekommer i två huvudsakliga typer, typ A och typ B. Förekomsten av en tredje celltyp har påvisats, som tros vara en odifferentierad variant. Samtliga tre celltyper är viktiga i upprätthållandet av homeostas i leden, eftersom de kan producera och utsöndra cytokiner, tillväxtfaktorer och inflammationsmediatorer (McIlwraith *et al.*, 2016). Typ A-synoviocyter har makrofagliknande beteendemönster och fagocyterar gärna. Typ B-synoviocyter är morfologiskt lika fibroblaster och står för utsöndring av bland annat HA till synovian (Palmer & Bertone, 1994).

**Ledvätska**, synovia, är en viskös, gulaktig vätska med en sammansättning som liknar blodplasma. Den anses vara ett ultrafiltrat av plasma (McIlwraith *et al.*, 2016).

Dess huvudsakliga funktion är att smörja leden och minska friktionen mellan ytorna i ledhålan. (McIlwraith *et al.*, 2016). Ledvätskan står även för näringstillförsel samt bortforsling av slaggprodukter från ledbrösket (Palmer & Bertone, 1994).

### **Ligament, muskler & senor**

Detta är strukturer som omger leden och ger upphov till en mekanisk stabilitet (Dyce *et al.*, 2010). Senor, ligament och den fibrösa delen av ledkapseln delar vissa strukturella likheter, de är cellfattiga men har ett rikligt ECM som består av kollagen typ I och III, PG, GAG och vatten (McIlwraith *et al.*, 2016).

## **Osteoartrit**

OA är en kronisk progressiv ledsjukdom (Skiöldebrand *et al.*, 2017; Liu-Bryant & Terkeltaub, 2015) som är en vanlig orsak till hälta hos hästar (McIlwraith *et al.*, 2016). Hos häst karaktäriseras OA bland annat av brosknedbrytning, skleros i subkondralt ben, osteofyter, synovit, kapsulit och ligamentskador (Skiöldebrand, 2004). Sjukdomen är en grupp av patologiska ledförändringar som kan involvera hela ledorganet (McIlwraith *et al.*, 2016) och leder till smärta samt förlorad ledfunktion (Skiöldebrand, 2004).

## **Etiologi**

OA är en komplex sjukdom (Berenbaum, 2012) och det finns flera potentiella bakomliggande orsaker till att sjukdomen bryter ut (Skiöldebrand, 2004). Hos människa finns en korrelation mellan OA och hög ålder (Berenbaum, 2012), medan sjukdomen hos häst kan uppstå både hos yngre sporthästar samt hos äldre hästar (McIlwraith *et al.*, 2016).

Lokal inflammation och låggradig systemisk inflammation utgör källor för inflammationsmediatorer som visat sig potentiellt viktiga för utveckling och upprätthållande av OA. Även det medfödda immunförsvaret kan ge upphov till lokal inflammation. (Berenbaum, 2012).

Förutom inflammation finns även en hypotes om att trauma kan trigga sjukdomsprocessen, som en följd blir leden instabil och detta kan i sin tur påverka ledorganet och leda till OA (Skiöldebrand, 2004). Även mekanisk stress tros kunna starta OA-processen. På kondrocyter och subkondrala benceller finns mekanoreceptorer som stimuleras av mekaniska krafter, dessa kan via intracellulär signalering öka förekomsten av kemokiner och cytokiner i leden (Berenbaum, 2012). Ledbrosket är utformat för att motstå belastning upp till ett visst tröskelvärde, när detta värde överskrids genom att leden utsätts för hög stötvis belastning kan det initiera brosknedbrytning (McIlwraith *et al.*, 2016).

## **Patogenes**

OA leder till en obalans mellan syntes och nedbrytning av ECM-komponenter, detta resulterar i att ledbrosket bryts ner (Sofat, 2009). De leder som visat sig mest benägna att drabbas av OA är karpalleder, kotleder, distala intertarsalleder och tarsometatarsalleder (Skiöldebrand, 2004).

Brosknedbrytningen sker i två steg, inledningsvis en biosyntetisk fas då kondrocyterna försöker reparera skadorna som uppkommer i ECM genom att öka syntesen av matrixmolekyler. Nedbrytningsfasen är steg två, den inleds när kondrocyternas reparationsförsök inte längre är tillräckliga för att upprätthålla normalstruktur och de katabola processerna i brosket tar över. Kondrocyten producerar själv de enzymer som bryter ner ECM och i fas två inhiberas dessutom syntesen av ECM-molekyler och bidrar till att brosknedbrytningen går snabbare (Sandell & Aigner, 2001).

Nedbrytningen av ECM sker i en viss ordning, där aggregat och COMP bryts ner i ett tidigt sjukdomsskede (Svala *et al.*, 2015). Trots den ökade syntesen av matrixkomponenter



så sker en nettoförlust av PG i detta skede (Sandell & Aigner, 2001). Kollagen typ II bryts ner sent i sjukdomsförloppet (Svala *et al.*, 2015), detta leder till att broskvävnaden sväller och tappas viss funktion. Förlust av kollagen är ett kritiskt steg i brosknedbrytningen, eftersom syntesen av nya kollagenfibriller sker långsamt (Skiöldebrand, 2004).

Synovit och andra makroskopiska tecken på inflammation förekommer i senare sjukdomsstadier och ger upphov till kliniska symptom (Liu-Bryant & Terkeltaub, 2015).

**Inflammationsmediatorer** är viktiga i inflammationsprocessen som uppstår vid OA hos häst, exempel på mediatorer och enzymer är proinflammatoriska cytokiner, prostaglandiner, metalloproteinaser, aggreganser och fria radikaler (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Cytokiner** är peptiduppbyggda signalmolekyler (Palmer & Bertone, 1994) som bildas av synovialceller och kondrocyter i leden (Sandell & Aigner, 2001). De reglerar viktiga steg i inflammationsprocessen genom att stimulera kondrocyter och synoviocyter till syntes av katabola enzymer (Skiöldebrand, 2004), såväl som inhibera syntes av viktiga matrixkomponenter såsom kollagen typ II och PG (Sofat, 2009).

De proinflammatoriska cytokiner som är viktigast i OA-processen är IL-1 $\beta$  (interleukin-1) och TNF- $\alpha$  (tumour necrosis factor), där IL-1 anses viktigaste signalmolekylen för brosknedbrytningen medan TNF- $\alpha$  tros bidra till smärta (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Prostaglandiner** tillhörande grupp E (PGE2) orsakar vasodilatation och ökad smärtekänslighet (McIlwraith *et al.*, 2016). Molekylen produceras av kondrocyterna i inflammerade leder (McIlwraith *et al.*, 2016) och IL-1 $\beta$  är den cytokin som inducerar syntesen (Palmer & Bertone, 1994), medan TNF- $\alpha$  tros ansvara för frisläppningen från cellerna. PGE2 minskar PG-innehållet i ECM genom två verkningsmekanismer, minskad syntes och ökad nedbrytning (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Matrixmetalloproteinaser** (MMPs) är ett samlingsnamn för en grupp proteolytiska enzymer som anses särskilt viktiga för brosknedbrytningen (Mort & Billington, 2001) och kollektivt kan de bryta ner samtliga ECM-komponenter (McIlwraith *et al.*, 2016). MMPs syntetiseras av kondrocyter och synoviocyter (Mort & Billington, 2001) och är viktiga för den normala broskomsättningen. De uppregleras av proinflammatoriska cytokiner, exempelvis IL-1 $\beta$  (McIlwraith *et al.*, 2016). Förekomsten av MMP-3 och MMP-1 i synovia från OA-drabbade hästleder i kombination med påvisat hög MMP-aktivitet i lederna utgör bevis för att enzymerna är inblandade i sjukdomsprocessen (Skiöldebrand, 2004).

En undergrupp av MMPs som utgörs av bland annat kollagenaser, stromelysiner och gelatinaser har förmågan att bryta ned kollagen. Kollagenaser (MMP-1, -8, -13) står för den initiala klyvningen genom att bryta ner kollagenfibriller till mindre beståndsdelar, så att andra proteinaser såsom gelatinaser kan ta vid (Mort & Billington, 2001). MMP-13, även kallad kollagenas-3, anses det viktigaste enzymet vid OA eftersom det står för den största andelen kollagennedbrytning (Sandell & Aigner, 2001). Den första klyvningen som sker delar trippelhelixen så att två olika fragment bildas, de utgör 3/4 respektive 1/4 av den ursprungliga trippelhelixen (Rousseau & Garnero, 2012). Stromelysiner (MMP-3, -10, -

11) bryter ner PG och flera typer av kollagener, såsom typ II, IX och XI (Skiöldebrand, 2004).

De proteolytiska enzymerna syntetiseras som inaktiva proenzym i kondrocyterna och reglering av denna syntes i kombination med förekomsten av TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases) utgör den övergripande regleringen av den proteolytiska effekten (Skiöldebrand, 2004).

**Aggrekanaser** (ADAMTS) är en familj av MMPs, vars beståndsdelar utgörs av disintegrin, metalloproteas och trombospondin-typ-I. Aggrekanas-1 (ADAMTS-4) och aggrekanas-2 (ADAMTS-5) är ansvariga för nedbrytningen av aggrekan i ECM, som sker på fem specifika ställen i molekylens proteinkärna (Mort & Billington, 2001).

**Fria syreradikaler** förekommer i synovia hos OA-hästar, detta visar på att molekylerna är inblandade i sjukdomsförloppet. Det finns flera typer av fria radikaler som kan orsaka skador vid OA. ROS (reactive oxygen species) bildas vid mekaniska skador och jonformerna av superoxid, väteperoxid och hydroxyl frisätts från skadade vävnader. Som svar på mekaniska faktorer och inflammatoriska cytokiner kan kondrocyter producera NO (kvävemoxid) (McIlwraith *et al.*, 2016).

Syreradikalerna kan orsaka direkt skada i ECM genom att klyva HA i synovian (Palmer & Bertone, 1994) samt genom att bryta sönder alfakedjor som bygger upp kollagen (McIlwraith *et al.*, 2016).

**Skyddsmekanismer** i ledbrösket utgörs exempelvis av tillväxtfaktorerna TGF- $\beta$  (transforming growth factor) och IGF-1 (insuline-like growth factor), som är anabola cytokiner som stimulerar syntes av ECM-molekyler (Sandell & Aigner, 2001). De verkar skyddande på ledbrösket genom att stimulera matrixproduktion och inhibera matrixnedbrytande enzymer (McIlwraith *et al.*, 2016).

### **Patologiska förändringar i olika sjukdomsstadier**

De olika sjukdomsstadierna kännetecknas enligt Zachary & McGavin av särskilda förändringar, både makro- och mikroskopiska (Tabell 1).

En tidslinje för nedbrytningen av broskets matrixmolekyler tydliggjordes av Svala *et al* (2015) med en *in vitro*-modell av broskexplantat som stimulerades med den proinflammatoriska cytokinen IL-1 $\beta$ . Studien visade att aggrekan och COMP bryts ner tidigt i sjukdomsförloppet, medan det kollagena nätverket (kollagen typ II) är bland de sista molekylerna som bryts ner.

Tabell 1. Relevanta förändringar som kan uppstå i OA-leder i olika sjukdomsskeden (egen omarbetning (Zachary & McGavin, 2012; Sandell & Aigner, 2001))

Sjukdomsskede	Makroskopiska förändringar	Mikroskopiska förändringar
Tidig	Brosk eventuellt mjukare vid palpering	Mild ökning av broskets tjocklek/svullnad pga PG-förlust
Mild	Eventuellt ytliga erosioner i och förtunning av ledbrosket	Klusterformering av kondrocyter på skadeplatsen, yttlig broskfibrillering, kondrocytdöd
Måttlig	Lokalt utbredda områden med broskfibrillering	Broskförlust även i djupare zoner, förtjockat subkondralt ben, mild synovit, periartikulära osteofyter, klusterformering kondrocyter på skadeplatsen
Kronisk	Djupa erosioner i brosk, blottlagt och förtjockat subkondralt ben, osteofyter pga sekundär broskbildning, förtjockad ledkapsel	Samtliga makroskopiska förändringar, ev cystor i subkondrala benet, kroniskt inflammerat synovium, fibros

## Diagnostik

OA yttrar sig kliniskt i ett sent skede (Rousseau & Garnero, 2012). Hos hästar i Sverige är kotledsartrit den vanligaste diagnosen (Penell *et al.*, 2005) och ledproblem är den vanligaste utslagsorsaken (Egenvall *et al.*, 2006). Diagnos hos hästar ställs idag genom klinisk och radiologisk undersökning (Skiöldebrand *et al.*, 2017), även ultraljud, magnetisk resonanstomografi (MRI) och artroskopi används. En subjektiv håltbedömning utgör en del av den kliniska undersökningen (McIlwraith *et al.*, 2016).

Med röntgenundersökning kan endast förändringar i benvävnad och inte i omgivande mjukdelar påvisas (Bauer *et al.*, 2006). Röntgenbilder har därför dålig sensitivitet och dålig förmåga att upptäcka tidiga OA-förändringar (Rousseau & Garnero, 2012), varför sjukdomen ofta nått irreversibla stadier innan den upptäcks (Skiöldebrand *et al.*, 2017). Det är önskvärt att ta fram fungerande biomarkörer eftersom de kan ha potential att ge en ögonblicksbild av rådande sjukdomssituation i specifika leder (Skiöldebrand, 2004) och därmed göra det möjligt att upptäcka sjukdomen tidigare (McIlwraith *et al.*, 2016).

## **Biomarkörer**

Enligt Biomarker Definitions Working Group (McIlwraith *et al.*, 2016) är definitionen av en biomarkör ”en objektiv indikator på normala biologiska processer, sjukdomsalstrande processer, eller farmakologiska responser på terapeutiska interventioner” (Bauer *et al.*, 2006; McIlwraith *et al.*, 2016).

Markörerna kan delas in i ”torra” och ”våta” eller ”lösliga”, där de torra innefattar exempelvis bilder och frågeformulär. De lösliga utgörs av genetiska markörer och biokemiska molekyler som kan mätas, exempelvis i blod, serum, urin, synovia och vävnadsprover (Kraus *et al.*, 2011). Vidare kan de lösliga markörerna delas in i direkta och indirekta, där de direkta kan användas för att mäta vävnadsomsättning och ger en bild av de anabola och katabola processer som pågår vid mätningstillfället, exempelvis ECM-fragment. Till de indirekta markörerna räknas exempelvis cytokiner och enzymer som påverkar vävnadsomsättningen, men inte själva bildas till följd av processerna (McIlwraith *et al.*, 2016). De direkta biomarkörerna har visat sig ha en högre sensitivitet och analysstabilitet jämfört med cytokinerna, som har en kort halveringstid och därmed är av mer akut natur (Bay-Jensen *et al.*, 2016).

## **BIPED**

2006 skrev Bauer *et al* en artikel där ett klassificeringssystem för biomarkörer framtaget av Osteoarthritis Biomarkers Network presenterades. Systemet syftar till att underlätta framtida forskning kring markörerna genom att dela in dem i fem undergrupper. BIPED står för Burden of disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of intervention och Diagnostic.

B-markörer är sådana som bedömer sjukdomens svårighetsgrad vid en viss tidpunkt, hos individer med OA. I-markörer är inte tillräckligt utredda för att kunna räknas in i någon av de övriga kategorierna. P-markörer är prognostiska markörer, som kan förutse utbrott av OA hos patienter som inte är sjuka vid provtillfället eller förutse sjukdomsutveckling hos patienter med OA. E-markörer ger information olika behandlingsalternativs effektivitet i olika situationer, antingen hos OA-drabbade eller de som har risk att utveckla sjukdomen. D-markörer är diagnostiska och kan användas för att på individnivå skilja sjuka patienter från friska (Bauer *et al.*, 2006; Bay-Jensen *et al.*, 2016; McIlwraith *et al.*, 2016).

## **Potentiella biomarkörer**

Det förekommer ett omfattande antal studier på människa som syftar till att utveckla och testa nya biomarkörer, såväl som utvärdera tidigare kända markörer (Bay-Jensen *et al.*, 2016). De flesta kända biomarkörer har visat sig fungera på flertalet djurarter, men det finns vissa skillnader mellan djur och människor som gör att resultaten inte nödvändigtvis är direkt överförbara mellan olika djurarter. I detta arbete har endast COMP och CTX-II tagits upp, eftersom de anses vara av särskilt intresse för att spegla OA hos häst (McIlwraith *et al.*, 2016).

**COMP** är en välstuderad molekyl, det finns fler än 50 studier gjorda på människa. Som biomarkör tros den mäta brosknedbrytning och kan möjligtvis komma att klassas som en B-, D- eller P-markör (Bay-Jensen *et al.*, 2016). Det finns även ett antal studier gjorda på häst, där koncentrationen av hela molekylen eller fragment mätts i synovia och serum (se Tabell 2) (McIlwraith *et al.*, 2016). COMP förekommer i normalt brosk, vid OA sker en fragmentering av ECM som leder till att det bildas unika klyvningsfragment (Skiöldebrand *et al.*, 2017). ELISA (enzymkopplad immunadsorberande analys) kan användas för att mäta COMP-koncentrationer, antingen hela molekylen eller fragment (Svala *et al.*, 2015).

Resultat från aktuella studier gör gällande att COMP-fragment förmodligen inte förekommer i normala broskomsättningen, utan bildas av katabola processer i inflammerat ledbrosk i ett tidigt sjukdomsskede (Skiöldebrand *et al.*, 2017; Svava *et al.*, 2015).

**CTX-II** (carboxy-terminal cross-linked fragment of type II collagen) har studerats i hög utsträckning hos människa och kan ha potential att användas som B-, D- och P-markör (Bay-Jensen *et al.*, 2016). Molekylen har studerats i viss utsträckning även hos hästar och har mätts bland annat i synovia och serum, den tros indikera klyvning av kollagen typ II och därmed katabola processer i ledbrosk (McIlwraith *et al.*, 2016). Antikroppsbaseade ELISA-tester som kan mäta olika kollagenfragment finns tillgängliga (McIlwraith *et al.*, 2016), CTX-II-test kan användas för att känna igen  $\frac{3}{4}$ -fragmentet som bildas vid kollagennedbrytningen (Rousseau & Garnero, 2012). Kollagen typ II är den ECM-molekyl som bryts ner sist i inflammerat ledbrosk (Svala *et al.*, 2015), varför det finns anledning att tro att markören kan komma att användas för att påvisa brosknedbrytning i ett sent skede. Det finns ett fåtal studier gjorda på häst som mäter förekomsten av CTX-II i synovia och serum (se Tabell 2).

Hos människa har CTX-II visat sig korrelera med allvarlighetsgrad av OA baserat på röntgenbedömning av patologiska förändringar (Bay-Jensen *et al.*, 2016), minst tre studier visar på en koppling mellan förhöjda CTX-II-nivåer i urin och antal leder drabbade av osteofyter. Detta talar för att markören har potential att användas som B-markör (Rousseau & Garnero, 2012).

Tabell 2. Sammanställning över aktuella studier gjorda på häst som använt ELISA för att mäta COMP och CTX-II i synovia (sf) och/eller serum, i hästar med osteoartrit (OA) och/eller osteokondros (OC)

Författare	Markör	Typ av antikroppar & riktade mot	Sjukdom eller skada	Resultat – jämfört med frisk kontrollgrupp	Antal hästar sjuka eller (sjuka:friska)
Skiöldebrand <i>et al.</i> , 2005	C O M P	Polyklonala, hela proteinet	OA & OC	COMP ↑ i sf från häst med OC	63
Arai <i>et al.</i> , 2005	C O M P	Monoklonala, fragment	OA & OC	COMP ↑ i sf	(100:80)
Yamanokuchi <i>et al.</i> , 2009	C O M P	Monoklonala, fragment	OA	COMP ↑ i sf & serum	(100:95)
Brink <i>et al.</i> , 2013	C O M P	Polyklonala, intakt & fragment	OC	COMP inte högre i sf från OC-hästar	(115:29)
Skiöldebrand <i>et al.</i> , 2017	C O M P	Polyklonala, neo-epitop/fragment	OA	COMP ↑ i sf från akut halta hästar	(24:15)
Cleary <i>et al.</i> , 2010	C T X- II	Monoklonala, epitop/fragment	OC	CTX-II sf & sf:serum ↑	(38:40)
Nicholson <i>et al.</i> , 2010	C T X- II	Monoklonala, hela proteinet	OC	CTX-II ↑ i sf från hästar med OC i karpalled, CTX-II ↓ i serum	(41:59)

## DISKUSSION

Den progressiva nedbrytningen av ledbrosk som är karaktäristiskt för OA är smärtsam och leder till hälta och förlust av ledfunktion (Skiöldebrand, 2004). De diagnostiska verktyg som används idag är inte nog känsliga för att fånga upp drabbade individer i ett tidigt sjukdomsskede (Rousseau & Garnero, 2012). Dessutom ställs diagnos till viss del baserat på subjektiva hältbedömningar, något som kan anses problematiskt eftersom det finns studier som visar på att bedömningarna kan skilja sig mellan olika bedömare, särskilt om hältan är förhållandevis mild (Keegan *et al.*, 2010).

Objektiva mätmetoder för att utvärdera hälta hos hästar är något av en bristvara i den kliniska verksamheten idag (McIlwraith *et al.*, 2016), men det finns ett behov av pålitliga mätmetoder och utveckling av dessa bör uppmuntras (Keegan *et al.*, 2010). Förutom biomarkörer finns även några andra potentiella objektiva metoder, exempelvis kinematisk mätning av hälta med hjälp av filmkameror som utvärderar rörelsemönster. Det finns dock omständigheter som gör att metoderna i dagsläget inte kan anses kliniskt praktiska (McIlwraith *et al.*, 2016). I jämförelse kan biomarkörerna anses förhållandevis användarvänliga, eftersom analys kan ske med flertalet provtyper (serum, synovia, urin) som dessutom redan rutinmässigt samlas in och används i kliniskt arbete.

Omfattande forskning kring biomarkörer hos människa finns, men flertalet studier har misslyckats med att erhålla upprepningsbara resultat (Bay-Jensen *et al.*, 2016). En anledning till att resultaten inte blir jämförbara kan vara att studierna skiljer sig i design och sker på olika underlag, varför olika resultatvärden erhålls (Skiöldebrand, 2004). Det faktum att patogenesen för OA fortfarande till viss del är okänd kan vara en annan anledning till misslyckandena (Bay-Jensen *et al.*, 2016). I de studier som är upptagna i detta arbete har olika typer av antikroppar använts, som är riktade mot olika fragment av biomarkörerna. Vissa antikroppar fångar upp intakta molekyler såväl som fragment, medan andra är specialiserade på fragment. Dessutom är det konstaterat att olika sjukdomsskeden genererar olika molekyelfragment, varför resultaten från de olika studierna inte nödvändigtvis är jämförbara.

Vid litteratursökningen som föregått denna rapport uppdagade sig en tidslinje, där tidig litteratur tar upp förekomsten av specifika molekyler men anger att deras funktion inte anses fastställd. COMP är ett exempel på en sådan molekyl, som sedan i mer aktuell litteratur inte bara visar sig viktig för normalfunktionen utan i dagsfärs forskning dessutom visar sig ha en roll i patogenesen såväl som en potentiell relevans för diagnostik.

Biomarkörernas förmåga att i dagsläget användas i den kliniska praktiken som diagnostisk metod på individnivå anses obefintlig (Rousseau & Garnero, 2012; McIlwraith *et al.*, 2016), eftersom de tillgängliga markörerna inte är tillräckligt känsliga. Trots att de flesta undersökta markörer förekommit i förhöjd koncentration hos människa med OA, finns det bland dem även en stor andel OA-patienter med normala värden. Flera studier har fått liknande resultat och denna skillnad skapar svårigheter att ta fram tröskelvärden som skiljer sjuka individer från friska kontroller (Rousseau & Garnero, 2012).

Forskningen har dock inte varit helt fruktlös. Flera studier har alstrat resultat som pekar på att användandet av specifika markörer tillsammans i en panel kan ge bättre prediktion om sjukdomsförloppet än användning av individuella markörer (Rousseau & Garnero, 2012; McIlwraith *et al.*, 2016).

Bay-Jensen *et al* (2012) skriver om ett EU-finansierat PPP-initiativ som syftar till att utveckla och ta fram nya biomarkörer genom att använda BIPED-klassificeringen vid hypotestestning. Denna satsning kommer förhoppningsvis välja ut och utveckla de biomarkörer med bäst potential och driva dem mot kvalificering.

Sammanfattningsvis konstateras att biomarkörerna COMP och CTX-II kan mätas i synovia och serum, men i dagsläget inte kan användas för att diagnostisera individuella hästar med OA. Det finns dock lovande resultat som talar för att biomarkörerna har potential att fungera som diagnostisk metod i framtiden, men vidare forskning krävs för att utveckla markörerna till kliniskt användbara. Det finns ett behov av att utveckla fungerande markörer att använda till människa såväl som häst. Behovet, i kombination med ekonomiska medel från EU, gör att utvecklingen verkar lovande.



## LITTERATURFÖRTECKNING

- Arai, K., Misumi, K., Carter, S. D., Shinbara, S., Fujiki, M. & Sakamoto, H. (2005). Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. *Equine Veterinary Journal* [online], 37(1), pp 31–36. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/0425164054406784/abstract>. [Accessed 2017-03-20].
- Bauer, D. C., Hunter, D. J., Abramson, S. B., Attur, M., Corr, M., Felson, D., Heinegård, D., Jordan, J. M., Kepler, T. B., Lane, N. E., Saxne, T., Tyree, B. & Kraus, V. B. (2006). Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage* [online], 14(8), pp 723–727. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458406001038>. [Accessed 2017-02-21].
- Bay-Jensen, A. C., Reker, D., Kjelgaard-Petersen, C. F., Mobasher, A., Karsdal, M. A., Ladel, C., Henrotin, Y. & Thudium, C. S. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage* [online], 24(1), pp 9–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458415013679>. [Accessed 2017-02-21].
- Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage* [online], 21(1), pp 16–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458412010254>. [Accessed 2017-02-21].
- Brink, P., Smith, R. K. W., Tverdal, A. & Dolvik, N. I. (2015). Changes in synovial fluid biomarker concentrations following arthroscopic surgery in horses with osteochondritis dissecans of the distal intermediate ridge of the tibia. *American Journal of Veterinary Research* [online], 76(7), pp 599–607. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/10.2460/ajvr.76.7.599>. [Accessed 2017-03-21].
- Cleary, O. B., Trumble, T. N., Merritt, K. A. & Brown, M. P. (2010). Effect of exercise and osteochondral injury on synovial fluid and serum concentrations of carboxy-terminal telopeptide fragments of type II collagen in racehorses. *American Journal of Veterinary Research* [online], 71(1), pp 33–40. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.71.1.33>. [Accessed 2017-03-20].
- Dyce, K. M., Sack, W. O. & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4th ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4160-6607-1.
- Egenvall, A., Penell, J. C., Bonnett, B. N., Olson, P. & Pringle, J. (2006). Mortality of Swedish horses with complete life insurance between 1997 and 2000: variations with sex, age, breed and diagnosis. *Veterinary Record* [online], 158(12), pp 397–406. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.158.12.397>. [Accessed 2017-03-13].
- Garnero, P., Ayral, X., Rousseau, J.-C., Christgau, S., Sandell, L. J., Dougados, M. & Delmas, P. D. (2002). Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* [online], 46(10), pp 2613–2624. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.10576>. [Accessed 2017-03-13].
- Garvican, E. R., Vaughan-Thomas, A., Clegg, P. D. & Innes, J. F. (2010). Biomarkers of cartilage turnover. Part 2: Non-collagenous markers. *The Veterinary Journal* [online], 185(1), pp 43–49. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310001206>. [Accessed 2017-03-01].
- Heinegård, D. & Saxne, T. (2011). The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* [online], 7(1), pp 50–56. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrrheum.2010.198>. [Accessed 2017-02-21].
- Keegan, K. G., Dent, E. V., Wilson, D. A., Janicek, J., Kramer, J., Lacarrubba, A., Walsh, D. M., Cassells, M. W., Esther, T. M., Schiltz, P., Frees, K. E., Wilhite, C. L., Clark, J. M., Pollitt, C. C., Shaw, R. & Norris, T. (2010). Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses. *Equine Veterinary Journal* [online], 42(2), pp 92–97. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516409X479568/abstract>. [Accessed 2017-03-13].
- Kraus, V. B., Burnett, B., Coindreau, J., Cottrell, S., Eyre, D., Gendreau, M., Gardiner, J., Garnero, P., Hardin, J., Henrotin, Y., Heinegård, D., Ko, A., Lohmander, L. S., Matthews, G., Menetski, J., Moskowitz, R., Persiani, S., Poole, A. R., Rousseau, J.-C. & Todman, M. (2011). Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and*

- Cartilage* [online], 19(5), pp 515–542. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458411000732>. [Accessed 2017-03-13].
- Liu-Bryan, R. & Terkeltaub, R. (2014). Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* [online], 11(1), pp 35–44. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrrheum.2014.162>. [Accessed 2017-02-22].
- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., Kawcak, C. E. & Weeren, R. van (Eds) (2016). *Joint disease in the horse*. Second edition. St. Louis, Missouri: Elsevier. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- Mort, J. S. & Billington, C. J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. *Arthritis Research*, 3(6), pp 337–341.
- Nicholson, A. M., Trumble, T. N., Merritt, K. A. & Brown, M. P. (2010). Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations of type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research* [online], 71(7), pp 741–749. Available from: <http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.71.7.741>. [Accessed 2017-03-21].
- Palmer, J. L. & Bertone, A. L. (1994). Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. *Equine Veterinary Journal* [online], 26(4), pp 263–277. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04386.x/full>. [Accessed 2017-02-07].
- Penell, J. C., Egenvall, A., Bonnett, B. N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Veterinary Record* [online], 157(16), pp 470–477. Available from: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/157/16/470>. [Accessed 2017-03-13].
- Roughley, P. J. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Research*, 3(6), pp 342–347.
- Rousseau, J. C. & Garnero, P. (2012). Biological markers in osteoarthritis. *Bone* [online], 51(2), pp 265–277. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328212008241>. [Accessed 2017-02-21].
- Sandell, L. J. & Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research*, 3(2), pp 107–113.
- Skiöldebrand, E. (2004). *Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training*. Diss. Uppsala: Dept. of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish Univ. of Agricultural Sciences.
- Skiöldebrand, E., Ekman, S., MattssonHultén, L., Svala, E., Björkman, K., Lindahl, A., Lundqvist, A., Önerfjord, P., Sihlbom, C. & Rüetschi, U. (2017). Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neo-epitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal* [online], p n/a-n/a. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.12666/abstract>. [Accessed 2017-02-20].
- Skiöldebrand, E., Heinegård, D., Eloranta, M.-L., Nilsson, G., Dudhia, J., Sandgren, B. & Ekman, S. (2005). Enhanced concentration of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in osteochondral fractures from racing Thoroughbreds. *Journal of Orthopaedic Research* [online], 23(1), pp 156–163. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.orthres.2004.05.013/abstract>. [Accessed 2017-03-01].
- Sofat, N. (2009). Analysing the role of endogenous matrix molecules in the development of osteoarthritis. *International Journal of Experimental Pathology* [online], 90(5), pp 463–479. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2613.2009.00676.x>. [Accessed 2017-02-21].
- Svala, E., Löfgren, M., Sihlbom, C., Rüetschi, U., Lindahl, A., Ekman, S. & Skiöldebrand, E. (2015). An inflammatory equine model demonstrates dynamic changes of immune response and cartilage matrix molecule degradation in vitro. *Connective Tissue Research* [online], 56(4), pp 315–325. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/03008207.2015.1027340>. [Accessed 2017-03-20].

- Yamanokuchi, K., Tagami, M., Nishimatsu, E., Shimizu, Y., Hirose, Y., Komatsu, K. & Misumi, K. (2009). Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. *Equine Veterinary Journal* [online], 41(1), pp 41–46. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2746/042516408X330356/abstract>. [Accessed 2017-03-20].
- Zachary, J. F. & McGavin, M. D. (Eds) (2012). *Pathologic basis of veterinary disease*. 5th ed. St.Louis, Mo: Elsevier. ISBN 978-0-323-07533-6.